

Određivanje varijabilnosti masline DNA markerima

Majić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:632676>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Određivanje varijabilnosti masline DNA markerima

DIPLOMSKI RAD

Mia Majić

Zagreb, srpanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Biljne znanosti

Određivanje varijabilnosti masline DNA markerima

DIPLOMSKI RAD

Mia Majić

Mentor:

doc. dr. Aleš Vokurka

Zagreb, srpanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Mia Majić**, JMBAG 0178105160, rođena 18.2.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Određivanje varijabilnosti masline DNA markerima

Svojim potpisom jamčim:

1. da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
2. da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
3. da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
4. da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
5. da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Mije Majić, JMBAG 0178105160, naslova

Određivanje varijabilnosti masline DNA markerima

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Aleš Vokurka, mentor

2. prof. dr. sc. Đani Benčić, član

3. doc. dr. sc. Kristina Batelja Lodeta, član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno svojim roditeljima na podršci tokom studiranja. Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene i hrabрили me. A posebno hvala mojoj kolegici i prijateljici Eni koja je svih ovih godina bila moj oslonac i podrška tokom svih uspona i padova za vrijeme studiranja na fakultetu.

Posebno hvala mentoru, doc. dr. sc. Alešu Vokurki na trudu, vremenu i savjetima koje je uložio pomažući mi pri izradi ovog diplomskog rada!

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Cilj rada	2
3. Pregled literature.....	3
3.1. Mutacije kao izvor varijabilnosti.....	3
3.2. Detekcija varijabilnosti klasičnim metodama.....	3
3.3. Detekcija varijabilnosti molekularnim markerima	3
4. Materijali i metode	7
4.1. Biljni materijal i nomenklatura uzoraka	7
4.2. Sakupljanje lisnog tkiva i izolacija DNA	11
4.3. SSR analiza.....	13
4.4. AFLP analiza.....	14
4.5. Statistička analiza	16
5. Rezultati i rasprava	17
5.1. Rezultati analize mikrosatelitskih markera	17
5.2. Rezultati analiza AFLP markera	19
6. Zaključak.....	26
7. Popis literature	27
Životopis	31

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Mia Majić**, naslova

Određivanje varijabilnosti masline DNA markerima

Maslina je suptropska biljka, jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura i simbol mediteranske regije. Koristi se za stolnu upotrebu, ali najviše je cijenjena za proizvodnju maslinovog ulja. Postoji mnogo homonima i sinonima u imenima sorata, posebno kod sorata lokalnog značaja, što često dovodi do problema, općenito u maslinarstvu, ali posebno u rasadničarskoj proizvodnji. Maslina je dugovječna drvenasta biljka za koju se, zbog specifične morfologije, pretpostavlja da unutar različitih dijelova istog stabla može imati nakupljene mutacije koje uvjetuju genetsku i fenotipsku varijabilnost. Deskriptivne metode zasnovane na fenotipu su neophodne za opis sorata, ali opis sorata može varirati zbog većeg ili manjeg utjecaja okoliša na genotip, što se odražava na fenotipu. Molekularni DNA markeri su nadopuna deskriptivnim metodama, a pomoću njih je moguće ustanoviti i variranja na samom genomu masline, neovisno o utjecaju okoliša.

U ovom istraživanju provedene su SSR i AFLP analize nekoliko starih i vrlo starih stabala masline sorata 'Drobnica', 'Karbunčela', 'Galica' i 'Oštrica' za koja postoji pretpostavka da imaju akumulirane mutacije unutar istog stabla. Uzorci za DNA analizu tih sorata sakupljeni su u nasadima na Ugljanu i Pašmanu, te u okolici Zadra, i to sa različitih pozicija unutar istog stabla, s pretpostavkom da između tih pozicija postoji varijabilnost na razini genoma.

Cilj istraživanja bio je, prvo, pomoću SSR markera utvrditi isti identitet za različita stabla koja pripadaju istoj sorti, i drugo, pomoću AFLP markera utvrditi postojanje genetske varijabilnosti unutar istog stabla kao posljedicu nakupljanja mutacija. Potvrđen je isti sortni identitet između stabala unutar svake sorte. Utvrđena je varijabilnost unutar sorata između različitih stabala, kao i unutar različitih dijelova istog stabla, i to kod sve četiri sorte.

Ključne riječi: maslina, molekularni markeri, mutacije

Summary

Of the master's thesis – student **Mia Majić**, entitled

Determination of olive variability by DNA markers

The olive is a subtropical plant, one of the most important agricultural crops and a symbol of the Mediterranean region. It is used for table consumption, but is mostly prized for the production of olive oil. There are many homonyms and synonyms in cultivar names, especially in cultivars of local significance, which often leads to problems, generally in olive growing, but especially in nursery production. Olive is a long-lived woody plant for which, due to specific morphologies, it is assumed that within different parts of the same tree may have accumulated mutations that cause genetic and phenotypic variability. Phenotype-based descriptive methods are necessary to describe cultivars, but the description of cultivars may vary due to a greater or lesser environmental impact on the genotype, which is reflected in the phenotype. Molecular DNA markers are complementary to descriptive methods, and they can be used to detect variations in the olive genome itself, regardless of environmental influences.

In this research, SSR and AFLP analyzes of several old and very old olive trees of the varieties 'Drobnica', 'Karbunčela', 'Galica' and 'Oštrica' were performed, which are presumed to have accumulated mutations within the same tree. Samples for DNA analysis of these cultivars were collected in plantations at Ugljan and Pašman, and in the vicinity of Zadar, with different positions within the same tree, assuming that there is variability between these positions at the genomic level.

The aim of the study was, first, to confirm the same identity for a different tree belonging to the same variety using SSR markers, and second, to determine the existence of genetic variability within the same tree as a result of mutations, using AFLP markers. The same varietal identity between trees within each variety was confirmed. Variability was found within cultivars between different trees, as well as within different parts of the same tree, in all four cultivars.

Keywords: olive, molecular markers, mutations

1. Uvod

Maslina (*Olea europaea* L.) simbol je mediteranske regije te je jedna od najraširenijih voćnih kultura priobalne Hrvatske koja obuhvaća Istru, priobalni pojas Kvarnera i otoke te priobalni pojas Dalmacije s otocima. Osim u Hrvatskoj, tradicionalna je kultura drveća sa značajnim kulturnim i gospodarskim interesom i u svim ostalim mediteranskim zemljama. Stablo masline (*O. europaea* L.) postoji u dva oblika: kultivirani (*O. europaea* subsp. *europaea* var. *sativa*) i divlji oblik (*O. europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Maslina je subtropska, diploidna i stranooplodna biljna vrsta. Važan je dio ljudske prehrane kao stolna maslina ili maslinovo ulje, te je jedna od ekonomski najznačajnijih kultura u proizvodnji ulja u mediteranskoj regiji. Prema podacima Državnog zavoda za statistiku u 2017.g. u Republici Hrvatskoj proizvedeno je 28.947 tona maslina, odnosno oko 37.463 hl maslinovog ulja. Prema istim podacima, površina pod maslinicima u 2017. godini iznosila je 18.683 ha, što zauzima ukupno 1,2% ukupne površine namijenjene za uzgoj poljoprivrednih kultura. Zbog sastava masnih kiselina i sadržaja ostalih funkcionalnih sastojaka hrane, zanimanje za maslinovo ulje kao zdrav izvor masti proširilo se i izvan mediteranske regije, diljem svijeta. Zbog prijevara i zamjena djevičanskog ulja jeftinim uljima i kako bi se iste izbjegle, potrebna je identifikacija sorti masline i autentifikacija djevičanskog maslinovog ulja. Prema Bandelj i sur. (2002.), procjena i karakterizacija genetskih resursa maslina stoga su prepoznati kao vrlo važni, jer su i produktivnost masline i kvaliteta ulja svojstva svojstvena sortama. Mnoge sorte sa značajnom fenotipskom i genotipskom raznolikošću proizlaze iz stoljeća prirodne selekcije (Ouazzani i sur., 1996.). Bogatstvo kultivirane germplazme masline izvanredan je slučaj među hortikulturnim kulturama, zbog dugovječnosti stabla i nedostatka prometa novim oplemenjivačkim genotipovima (Belaj i sur., 2011.).

Mutacije su značajan izvor varijabilnosti. Kod masline varijabilnost može biti i unutar istog stabla, u izbojima iz njegovih različitih dijelova kao što su guka, deblo i krošnja. S obzirom na mnogobrojne klonske razlike unutar istoimene sorte, identifikacija germplazme masline je otežana i komplicirana. Zbog velikog utjecaja okoliša na fenotip, kemijska analiza različitih nakupina spojeva i analiza morfoloških svojstava nisu dovele do identifikacije sorti (Ouazzani i sur., 1995.), stoga su danas sve više u upotrebi učinkoviti i pouzdani molekularni markeri. Prema Manel i sur. (2003.) i Baldoni i sur. (2006.) znanje o strukturi genetske raznolikosti ključni je čimbenik za upravljanje genetskim resursima u uspješnim oplemenjivačkim programima. Intenzivna razmjena i difuzija biljnog materijala na području mediteranskog bazena, uključujući i jadransku regiju, pridonijela je zabuni u imenovanju sorti i stvaranju velikog broja sinonima (iste sorte nazivaju se različitim imenom) i homonima (različite sorte nazivaju se istim imenom), stoga je identifikacija sorte primarna je briga uzgajivača maslina, oplemenjivača i znanstvenika. Detaljno znanje o količini raznolikosti postojećih sorti i raspodjeli genetske varijabilnosti predstavljaju osnovu za planiranje strategije očuvanja i za odabir genotipova s poželjnim svojstvima u nacionalnim programima uzgoja maslina. (Lazović i sur., 2018.)

2. Cilj rada

Cilj rada je sljedeći:

prvo, potvrditi isti identitet za sva stabla od po svake od četiri sorte uključene u istraživanje ('Oštrica', 'Karbunčela', 'Drobnica' i 'Galica') korištenjem DNA analiza mikrosatelitskih molekularnih markera (SSR), i to prema principu identitetnih grupa, tj. potvrda pripadnosti svih uzoraka pretpostavljene sorte unutar iste identitetne grupe; i

drugo, utvrditi postojanje genetske varijabilnosti, odnosno varijabilnosti na razini DNA kao posljedice nakupljanja mutacija unutar istog stabla ijedne te iste sorte, i to metodom AFLP sustava molekularnih DNA markera.

3. Pregled literature

3.1. Mutacije kao izvor varijabilnosti

Varijabilnost je proces nastajanja različitih jedinki unutar jedinki iste vrste te ona može biti nasljedna ili nenasljedna. Genetska varijabilnost posljedica je rekombinacije gena i mutacija u početnoj genetskoj populaciji. Budući da su stabla masline pretežno alogamna, prisutne su visoke razine heterozigotnosti i polimorfizama DNA među kultivarima (Doveri i sur., 2008.). Velika raznolikost masline vjerojatno je posljedica raznolikog podrijetla germplazme, kao rezultat križanja između divljih i kultiviranih maslina, što je u konačnici rezultiralo novim sortama (Gomes i sur., 2009.). Kako bi oplemenjivački programi bili dugoročno uspješni i kako bi se maksimiziralo iskorištavanje resursa germplazme masline, nužno je poznavanje varijabilnosti među postojećim sortama. Zbog visoke genetske varijabilnosti masline i prisutnosti homonima i sinonima potrebne su učinkovite i brze diskriminacijske metode.

3.2. Detekcija varijabilnosti klasičnim metodama

Varijabilnost masline tradicionalno se procjenjivala morfološkim metodama (Belaj i sur., 2002.). Morfološki opisi Međunarodnog vijeća maslina (COI, 1997.) obično se primjenjuju za opis i identifikaciju sorti maslina (Abdessemed i sur., 2015.). Temelje se na opisu mase i oblika koštice i ploda te duljini, širini i omjeru lišća. Morfološka svojstava podložna su utjecaju čimbenika okoliša, biljnoj dobi i fenologiji, a budući da je objektivnost presudna za precizno morfološko tipiziranje, teško je koristiti takve osobine u identifikaciji masline i karakterizaciji genetskih odnosa (Ercisli i sur., 2011.). Prema istraživanju Strikića i sur. (2009.), geografska širina imala je najveći utjecaj na morfološke karakteristike masline, zatim geografska širina i nadmorska visina. Korelacija između morfoloških karakteristika i geografskih koordinata iznosila je 25,7%, što ukazuje na snažan utjecaj okoliša na morfologiju, stoga je upotreba morfološke karakterizacije upitna i nepouzdana.

3.3. Detekcija varijabilnosti molekularnim markerima

Genetski marker je gen ili DNA sekvenca s poznatim mjestom kromosoma koji kontrolira određeni gen ili osobinu. Genetski markeri su grupirani u dvije kategorije: klasični markeri (morfološki, citološki i biokemijski) i DNA/molekularni markeri (Azhar Nadeem i sur., 2017.). Molekularni markeri koriste se za razlikovanje sorti maslina, određivanje izvornih sorti i proučavanja genetske raznolikosti pružajući diskriminacijski sustav koji je neovisan o uvjetima okoliša (Abdessemed i sur., 2015.). Danas postoji i dostupno je nekoliko molekularnih

markera, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*), ISSR (*Intersimple Sequence Repeat*), SSR (*Simple-sequence repeats*), i ti biljezi pružaju točan i nedvosmislen alat za preciznu identifikaciju kultivirane masline (Ercisli i sur., 2012.).

Analiza molekularnih markera započinje izolacijom kvalitetne DNA koja mora imati što veću koncentraciju, što manji stupanj razlomljenosti i onečišćujućih primjesa. Izolacija se sastoji od nekoliko koraka: sušenje i usitnjavanje uzorka te na kraju sama izolacija DNA od ostalih komponenti kao što su proteini, RNA, polifenoli i polisaharidi. Zatim slijedi lančana reakcija polimeraze, odnosno PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) metoda kojom se amplificira jedna ili nekoliko kopija dijela DNA uz pomoć početnica ili primera (oligonukleotidni fragmenti oko 20 parova baza), generirajući tisuće do milijuna kopija određene sekvence DNA. PCR ima tri stadija: denaturacija DNA, nalijeganje primera na komplementarno mjesto na početnoj molekuli DNA i amplifikacija DNA. U prvom stadiju dolazi do denaturacije tj. rasplitanja DNA uslijed pucanja vodikovih veza zbog visoke temperature (90 – 97°C). Nakon što se komplementarni lanci dvolančane DNA razdvoje, primeri uz pomoć enzima *Taq DNA-polimeraza* nalegnu na komplementarno mjesto te se amplificiraju koristeći izvorne lance kao predloške. Tako svaka molekula DNA sadrži jedan stari i jedan novi lanac DNA. Zatim slijedi tehnika elektroforeze, koja se obavlja u aparaturi za elektroforezu. Fragmenti molekule DNA mobilni su u električnom polju te se nakon stavljanja u aparaturu za elektroforezu, u želatinozni gel, razdvoje prema anodi i katodi, ovisno o molekularnoj masi. Potom slijedi bojanje kako bi se mogli očitati rezultati, a to su jedna ili nekoliko crtica unutar jedne pruge.

RFLP je bila prva tehnika molekularnih markera i jedini sustav biljega koji se temelji na hibridizaciji, a markeri na osnovi PCR-a su RAPD, AFLP, SSR ili mikrosateliti i ISSR. RAPD, AFLP i mikrosatelitski biljezi pružaju izravne genotipske informacije vrijedne za brojne primjene u genetskim studijama (Bandelj i sur., 2004.). Molekularni markeri mogu se koristiti za određivanje genetskih odnosa među sortama ili za identifikaciju i mapiranje lokusa koji utječu na jednostavna ili složena svojstva (QTL - *quantitative trait loci*) (Carriero i sur., 2002.). Budući da svaka vrsta molekularnog markera ima svoje pozitivne i negativne strane, izbor markera koji će se koristiti u istraživanju prvenstveno ovisi o ciljevima istraživanja.

Mikrosateliti se nazivaju i SSR markerima, a temelje se na PCR metodi. To su dijelovi molekule DNA koji se sastoje od višestruko ponavljajuća kratka nukleotida (1-6). Nalaze se u genomu, kloroplastu i mitohondrijima. Mikrosateliti mogu biti mononukleotid (A), dinukleotid (GT), trinukleotid (ATT), tetranukleotid (ATCG), pentanukleotid (TAATC) i heksanukleotid (TGTGCA) (Azhar Nadeem i sur., 2017.). Razvijeni su za razumijevanje genetskih odnosa maslina, karakterizaciju sorte i za oplemenjivačke programe (Gomes i sur., 2009.). Mikrosateliti su jedan od najčešće korištenih za genotipizaciju maslina i diskriminaciju sorti pomažući tako racionalnom upravljanju i korištenju genetskog nasljedstva (Abdessemed i sur., 2015.). Štoviše, SSR markeri su prikladni za razlikovanje usko povezanih genotipova i klonsku identifikaciju unutar sorti maslina zbog visokog stupnja varijabilnosti i multialelnih stanja. SSR-ovi su kodominantni, imaju višu razinu polimorfizma i veći sadržaj informacija, procjenjeno

očekivanom heterozigotnošću, od AFLP-a i RAPD-a (Belaj i sur., 2003.), stoga je ovaj sustav biljega najpouzdaniji, najučinkovitiji i najjednostavniji za upotrebu identifikacija sorti maslina (Ercisli i sur., 2011.). Prema Azhar Nadeem i sur. (2017.) SSR testovi zahtijevaju vrlo male uzorke DNA (~ 100 ng po jedinki) i niske početne troškove za ručne metode ispitivanja te su u više studija ocijenjen kao najbolji za sortnu identifikaciju.

Genetske veze između kultiviranih maslina, divljih formi i srodnih vrsta proučavane su pomoću AFLP markera (Bandelj i sur., 2004.). AFLP markeri kombinacija su RFLP i PCR tehnologije i time su riješena sva ograničenja koja su se pojavljivala pri korištenju RAPD i RFLP markera. Prvi uvjet koji treba biti zadovoljen je visoko kvalitetna i čista DNA koja ne smije biti kontaminirana. Ona se zatim probavlja pomoću dva restriksijska enzima, rijetki rezač (kao što je *EcoRI*) i česti rezač (kao što je *MseI*). Potom se u procesu ligacije na svaki kraj fragmenata povežu adapteri koji služe za PCR amplifikaciju u kasnijim koracima. Adapteri su kratke oligonukleotidne sekvence sačinjene od 14 - 20 baznih parova. Potom slijedi amplifikacija koja ima dvije faze, prva je pre-selektivna, a druga selektivna amplifikacija. Budući da se tokom restrikcije dobiva na tisuće fragmenata koje je teško odvojiti i analizirati, u pre-selektivnoj fazi se nekoliko fragmenata selektivno pojačava koristeći primere s dodanim nukleotidom na tri osnovna kraja. Zatim slijedi selektivna amplifikacija u kojoj se koriste primeri s dodane tri nukleotidne baze. Nakon izvođenja PCR-a, vizualizacija se vrši u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Prema Azhar Nadeem i sur. (2017.) AFLP biljezi su isplativi i nisu potrebne prethodne informacije o redoslijedu. AFLP biljezi tehnički su zahtjevniji od RAPD-a, ali vrlo učinkoviti u otkrivanju polimorfizama DNA (Bandelj i sur., 2004.). AFLP markeri su najučinkovitiji sustav biljega zbog svoje sposobnosti da otkriju najveći broj traka po reakciji i zbog visokih vrijednosti postignutih za značajan broj indeksa (Belaj i sur., 2003.).

RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) je tehnika koja uključuje, kako i samo ime kaže, nasumičnu amplifikaciju DNA, koristeći nasumične primere. RAPD markeri su fragmenti DNA iz PCR amplifikacije slučajnih segmenata DNA korištenjem jednog, kratkog (10 nukleotida) i slučajnog primera (Azhar Nadeem i sur., 2017.). Tehnika započinje izolacijom genomske DNA koja se zatim amplificira PCR metodom, koristeći kratke dijelove nasumičnih primera. Cijeli proces završava razdvajanjem u agaroznom gelu elektroforeze. Polimorfizmi nastali kao posljedica mutacija vidljivi su u elektroforezi kao prisutnost ili odsutnost određene RAPD trake (Jiang, 2012.). Najviše se koriste za studije genetske sličnosti (Belaj i sur., 2002.) te za identifikaciju i tipizaciju identiteta maslina (Bandelj i sur., 2004.). Glavne prednosti RAPD markera su jednostavnost tehnike i njezini niski troškovi (Bandelj i sur., 2004.) te daje visoku razinu polimorfizma, ali im nedostaje dobra ponovljivost, što otežava usporedbu između pojedinih studija.

ISSR marker je temeljni primer dizajniran iz SSR regije. Amplificira segment DNA između dva SSR ponavljanja koja su identična, ali suprotno orijentirana, pomoću PCR metode. Jednostavni su, lako razumljivi u usporedbi s RAPD-om i nije potrebno prethodno znanje o DNA sekvencama. Dominantni su biljezi i imaju manju ponovljivost (Azhar Nadeem i sur., 2017.).

RFLP je prvi sustav DNA markera u povijesti molekularnih markera, važan za mapiranje biljnog genoma. Ova tehnika koristi restrikcijske enzime kako bi identificirala varijacije u homolognim sekvencama DNA. Za razliku od ostalih molekularnih markera, RFLP se temelji na hibridizaciji. Prvi korak ove tehnike je izolacija čiste DNA koja se potom miješa s restrikcijskim enzimima, a zatim se enzimi koriste za rezanje DNA na određenim lokusima. U slučaju kada se na mjestu prepoznavanja dogodi mutacija jednog baznog para, restrikcijski enzim ne reže fragment. Potom se fragmenti DNA odvajaju elektroforezom u agaroznom gelu te se stvara niz traka različitih duljina. Većina RFLP markera su dominantni (detektirat će se oba alela u heterozigotnom uzorku) i visoko su specifični za lokus (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*).

4. Materijali i metode

4.1. Biljni materijal i nomenklatura uzoraka

Biljni materijal je sakupljen u nekoliko starih ekstenzivnih nasada i pojedinačnih stabala maslina (Slike 4.1. i 4.2.) determiniranih prema fenotipu, tj. morfološkim karakteristikama, kao i prema iskazima vlasnika nasada i stabala kao sorte 'Oštrica', 'Galica', 'Karbunčela' i 'Drobnica'. Stabla su odabrana prema načelu starosti i prema načelu morfologije debla i krošnje. Starost stabala jest uvjet za nakupljene mutacije, a oblik i morfologija stabla, debla i krošnje omogućuje, tj. široko deblo, postojanje guke i izboja iz kojih izbijaju mladice relativno "udaljene" pozicije unutar jednog stabla za koje pretpostavljamo da bi na njima moglo biti nakupljenih mutacija.

Ukupno su odabrana dva stabla 'Oštrice' i tri stabla 'Drobnice' pretpostavljene starosti od više stotina godina, tri stabla 'Karbunčele' i jedno stablo 'Galice' starosti više od stotinu godina. Lokacije stabala su sljedeće: oba stabla 'Oštrice' su na otoku Ugljanu, Sutomišćica; sva tri stabla 'Drobnice' su iz Lukorana, također na otoku Ugljanu; tri stabla 'Karbunčele' su iz Ždrelca na otoku Pašmanu, a stablo 'Galice' je s lokacije Trsine u Petrčanama blizu Zadra.

Sva stabla su morfološki vrlo "razvedena", odnosno sastoje se od jednog ili više panjeva u odumiranju iz kojega izbijaju nova, mlađa debla (novi "panj"), oko kojih se nalazi više živih i vitalnih guka iz kojih izbijaju novi izboji. Primjer ovakve "razvedenosti" stabala na primjeru nasada 'Karbunčele' (Slika 4.1.), kao i na primjeru slike nepoznate sorte na Hvaru, ali koji dobro ilustrira pojam guke koja izbija iz baze "panja" i ima zadebljanje ili izboja koji također izbija iz panja, ali bez zadebljanja. (Slika 4.2).



Slika 4.1. Primjer "razvedenosti" stabala sorte 'Karbunčela' u starom nasadu na otoku Pašmanu (Foto: Bolarić)



Slika 4.2. Primjer "razvedenosti" stabala nepoznate sorte na kojem se vidi veliki "panj" s nekoliko guka koje imaju zadebljanje i izboja koji izbijaju iz tog "panja" (Hvar, Malo Grabje) (Foto: Vokurka)

Uzorci za DNA analize su, ovisno o raspoloživosti, mogli biti uzeti s različitih panjeva istog stabla, iz različitih guka s istog ili različitih panjeva, odnosno sa glavnine stabla iz vršnih izboja. Na temelju toga je učinjena i nomenklatura uzoraka (Tablica 4.1.) iz koje se vidi o kojoj se sorti radi (Drb = 'Drobnica', Gal = 'Galica', Krb = 'Karbunčela', Ost = 'Oštrica'), o kojem morfološkom dijelu stabla je riječ (p = panj, g = guka, v = vrh, i = izboj), pri čemu je svako stablo numerirano, kao i svaki morfološki dio stabla. Prema ovom sustavu označavanja, na primjer, uzorak označen kao Krb1-p.3.g.2 znači da je riječ o sorti 'Karbunčela', i to prvom stablu označenom brojem jedan, i da je uzorak za DNA analizu prikupljen s panja označenog brojem tri i sa guke broj dva koja izbija oko ili iz tog panja.

Tablica 4.1. Nomenklatura uzoraka: sorte su označene kraticom, stabla brojem, a dijelovi i pozicije na stablu s kojih su uzeti uzorci također kraticom i brojem.

Sorta	Kratica	Stablo
'Drobnica'	Drb	1., 2., 3.
'Galica'	Gal	1.
'Karbunčela'	Krb	1., 2., 4.
'Oštrica'	Ost	1., 2.

Pozicija	Kratica	Broj - oznaka
panj	p.	za različite pozicije navedeni su različiti brojevi
guka	g.	
vrh	v.	
izboj	i.	

Popis svih uzoraka i pozicija na stablu s kojih su sakupljeni je prikazan u tablici 4.2. Pozicije su važne upravo za kasnije obrazloženje rezultata i eventualno postojanje varijabilnosti i pojavu mutacija ovisno o pojedinim pozicijama.

Tablica 4.2. Popis svih sorata i njihovih uzoraka u analizi, kao i lokacija s kojih su uzorci prikupljeni.

Sorta	Kratica	Lokacija	Opis pozicije uzorka		
'Drobnica'	Drb1-g.1	Ugljan - Lukoran	Stablo 'Drobnice' br.1, uzorak iz guke br.1		
	Drb1-g.2		Stablo 'Drobnice' br.1, uzorak iz guke br.2		
	Drb1-p.1		Stablo 'Drobnice' br.1, uzorak iz panja br.1		
	Drb1-p.2.v.2		Stablo 'Drobnice' br. 1 uzorak iz panja br.2 i vrha br.2		
	Drb1-g.1.v.1		Stablo 'Drobnice' br.1, uzorak iz guke br.1 i vrha br.1		
	Drb2-p.1		Stablo 'Drobnice' br.2, uzorak iz panja br.1		
	Drb3-p.1		Stablo 'Drobnice' br.3, uzorak iz panja br.1		
'Galica'	Gal1-g.1	Petrčane	Stablo 'Galice' br.1, uzorak iz guke br.1		
	Gal1-g.2		Stablo 'Galice' br.1, uzorak iz guke br.2		
	Gal1-v.1		Stablo 'Galice' br.1, uzorak iz vrha br.1		
	Gal1-v.2		Stablo 'Galice' br.1, uzorak iz vrha br.2		
'Karbunčela'	Krb1-p.1.g.1	Ždrelac - Pašman	Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.1 i guke br.1		
	Krb1-p.2.g.1		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.2 i guke br.1		
	Krb1-p.3.g.1		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.3 i guke br.1		
	Krb1-p.3.g.2		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.3 i guke br.2		
	Krb1-p.3.g.3		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.3 i guke br.3		
	Krb1-p.1.v.1		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.1 i vrha br.1		
	Krb1-p.2.v.1		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.2 i vrha br.1		
	Krb1-p.3.v.1		Stablo 'Karbunčela' br.1, uzorak iz panja br.3 i vrha br.1		
	Krb2-p.1		Stablo 'Karbunčela' br.2, uzorak iz panja br.1		
	Krb4-p.1		Stablo 'Karbunčela' br.4, uzorak iz panja br.1		
	Krb4-p.1.i.1		Stablo 'Karbunčele' br.4, uzorak iz panja br.1 i izboja br.1		
	'Oštrica'		Ost1-p.1.g.1	Ugljan- Sutomišćica	Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz panja br.1 i guke br.1
			Ost1-p.2.g.1		Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz panja br.2 i guke br.1
Ost1-p.3.g.1		Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz panja br.3 i guke br.1			
Ost1-p.2		Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz panja br.2			
Ost1-v.1		Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz vrha br.1			
Ost1-v.2		Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz vrha br.2			
Ost1-v.3		Stablo 'Oštrica' br.1, uzorak iz vrha br.3			
Ost2-p.1		Stablo 'Oštrica' br.2, uzorak iz panja br.1			

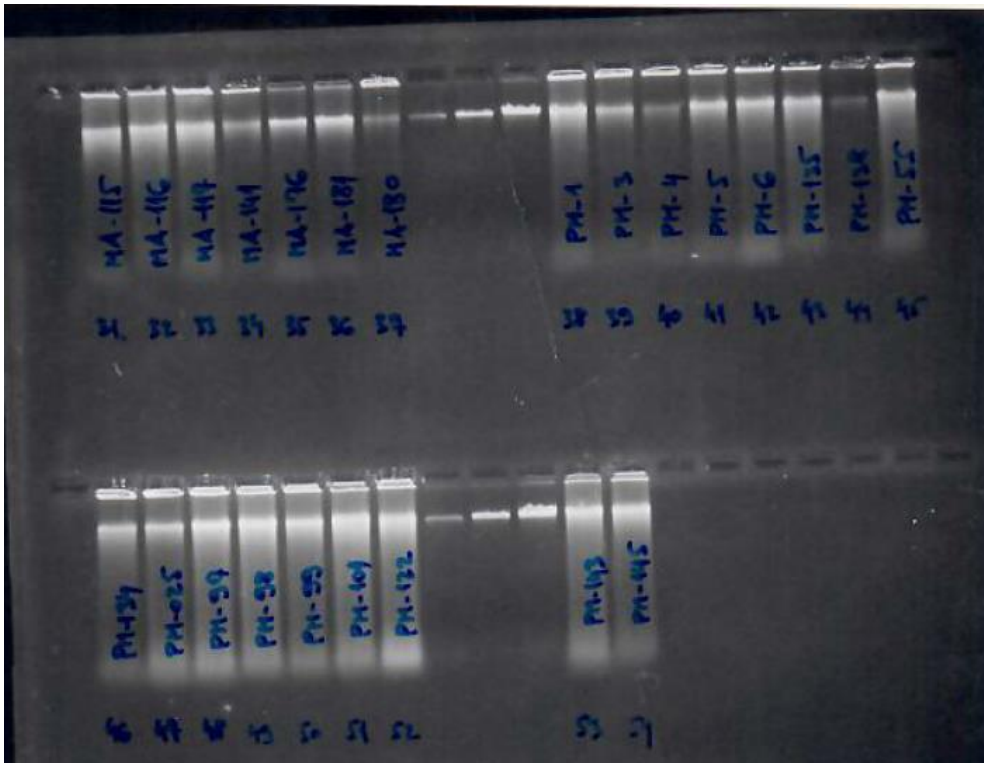
4.2. Sakupljanje lisnog tkiva i izolacija DNA

Listovi za izolaciju DNA iz svih stabala za koja je postojala pretpostavka da bi mogli imati nakupljenih mutacija sakupljeni su 2018. početkom ljeta. Za izolaciju je najbolje koristiti mlade i zelene listove, a sakupljati ih početkom ili u prvom dijelu vegetacijske sezone. Takvi listovi, ako se adekvatno prikupljaju kao uzorci i ako se adekvatno transportiraju i čuvaju, u daljnjoj obradi i izolaciji daju najbolje rezultate u smislu kvalitete i kvantitete izolirane DNA. Međutim, starije listove, ili čak listove fosilnog karaktera također je moguće koristiti za izolaciju DNA (Gugerli i sur., 2004.), ali u tom slučaju je postupak izolacije otežan, potrebni su prilagođeni protokoli, a izolirana DNA može biti manje zadovoljavajuća u smislu kvalitete i kvantitete. S druge strane, ako se koriste stariji listovi sakupljeni u podmaklim stadijima vegetacije izolacija DNA može biti otežana (Barta i sur., 2017.) zbog veće koncentracije nakupljenih biljnih metabolita u vakuolama i zbog čega protokoli za izolaciju često moraju nalagati modificirane i složenije korake purifikacije.

Listovi su sakupljeni tako da je sa svake pozicije na stablima masline, dakle sa točno određene guke, mladih izboja, vrha neke starije formacije izboja, ili sa panja uzeto nekoliko zdravih i čistih listova. Listovi se slože u presavinuti list filter papira kako bi papir upio vlagu od transpiracije. Svaki uzorak se zajedno sa filter papirom dalje stavlja u kovertu (u koje je prethodno dodan silika-gel), a po nekoliko koverti (dakle, po nekoliko uzoraka) stavi se u polivinilnu vrećicu, vrećica se dobro zatvori i do laboratorija ili hladnjaka se transportira u prijenosnom terenskom hladnjaku. Međutim, samim uzimanjem uzoraka započeo je i proces sušenja, i to na jednostavan način, upravo pomoću kuglica silika-gela koje su prethodno dodane u svaku kovertu i to u količini od otprilike jedne i pol jušne žlice. Tako sakupljeni uzorci se samo odlože u hladnjak na temp. od +4°C – +6°C i ostave nekoliko dana, a silika-gel kroz to vrijeme izvuče svu vlagu iz lista. Na ovaj jednostavan način moguće je osušiti uzorke za izolaciju DNA bez visokih ulaganja u liofilizator i zamrzivač za duboko smrzavanja na -80°C, što je standardna oprema u većini postupaka pripreme uzoraka za izolaciju DNA. Kod sakupljanja uzoraka potrebno je biti pažljiv i sistematičan, te dobro označiti sve prikupljene uzorke kako ne bi došlo do naknadnih zabuna ili zamjene uzoraka. Također je kod transportiranja potrebno biti brz koliko god to uvjeti na terenu omogućuju, i truditi se izbjeći moguće temperaturne šokove.

Nakon sušenja uzorci se samelju u fini prah, i to tako da se odvagne 25 mg suhog lisnog tkiva, premjesti u tubicu u koju se doda po jedna kuglica promjera sedam milimetara od nehrđajućeg čelika. Ovako pripremljena tubica postavi se u aparat za pulverizaciju laboratorijskih uzoraka (u ovom slučaju lista), naziva i marke Mixer Mill 400MM (Retsch, Njemačka). Mrvljenje se provodi brzim trešenjem, i to pod frekvencijom od 20 Hz i odmah se nastavlja sa izolacijom prema protokolu "Plant DNEasy Isolation Kit", odnosno prema uputstvima i pomoću pribora i potrošnog materijala, enzima i reagensa koje su sastavni dio "kita" (tj. kompleta) za izolaciju DNA. Reagensi koje sadrži navedeni komplet su uglavnom kemijske tvari za razbijanje stanične membrane i pročišćavanje DNA, dok se plastični pribor u kompletu odnosi na filtere i tubice. Potrebno je raspolagati laboratorijskom opremom, a to je mikrocentrifuga i pipete različitih volumena.

DNA je potrebno provjeriti prije daljnjeg korištenja, tj. odrediti njenu količinu i kvalitetu, te svesti na standardnu laboratorijsku koncentraciju. Kvaliteta i količina DNA se najjednostavnije provjerava u agaroznom gelu manje gustoće (najčešće 0,8% agaroze) u vodoravnoj elektroforezi. Agaroznoj otopini je potrebno dodati boju (Olerup), i to jednu kap, dok se priprema gel. Boja je vidljiva pod UV osvjetljenjem, a veže se unutar lanca DNA, pa na temelju svjetlosnog signala na digitalnoj fotografiji možemo procijeniti količinu DNA, kao i njenu kvalitetu. Parametri elektroforeze su sljedeći: trajanje 45 min, uz napon od 90 V, uz dodatak tzv. "stop-mixa", modre boje koji je lakši i brži u elektroforezi u usporedbi s DNA, ali se na osnovu njene pozicije može, tijekom elektroforeze, ustanoviti koju točku fragmenti DNA nisu prošli, pa se obično ta "oznaka" pušta da dođe do pred drugi kraj gela i u tom trenutku se elektroforeza zaustavlja. Zatim se agarozni gel fotografira sustavom za vizualizaciju GelDoc XR (marke Biorad, SAD) koji u komori za fotografiranje ima digitalnu kameru i UV svjetlo pod kojim dolazi do osvjtljivanja boje koja se vezala na fragmente DNA. Količina DNA se procjenjuje na temelju standardne DNA poznate koncentracije (komercijalni proizvod) koja se kroz elektroforezu pusti uz uzorke koje je potrebno analizirati. Takva "standardna" DNA može biti različitih koncentracija, ali najčešće se koriste koncentracije različitih "jakosti", od 5 do 100, pa i više ng/ μ l. Do zaključka o koncentraciji izolirane DNA dolazi se procjenom, tj. usporedbom svjetlosnog signala DNA koju analiziramo i standardnih uzoraka. Vizualizacija DNA pomoću UV svjetla nakon izolacije prikazan je na Slici 4.3.



Slika 4.3. Primjer vizualizacije uzoraka DNA nakon izolacije (Foto: Vokurka)

4.3. SSR analiza

Analiza mikrosatelitskih lokusa provedena je na deset mikrosatelitskih markera, i to prema prijedlogu konsenzualnih markera pomoću kojih je moguće razlikovati sve poznate sorte masline (Baldoni i sur., 2009.). Prema smjernicama navedenim u tom radu, korišteni su primeri prikazani u Tablici 4.3.

PCR-reakcija za analizu mikrosatelitskih fragmenata pripremljena je u volumenu od 25 μ l sa 4 ng genomske DNA, u puferskom mediju 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 i 50mM KCl. Upotrijebljeno je 0,5 U Taq polimeraze (Sigma), uz koncentraciju ostalih reagensa 2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM svakog dNTPa i 0,4 μ M svakog primera (*forward* i *reverse*). Oligonukleotidni primeri *forward* korišteni za SSR analizu obojani su specifičnim florescentnim bojama (DyeG5) kako bi ih bilo moguće kasnije vizualizirati u laserskom modulu kapilarne elektroforeze.

PCR reakcija se odvijala u aparatu *Veriti*TM 96-well Thermal Cycler (marke Applied Biosystems) prema temperaturnom režimu tzv. *touch down* protokola:

**95°C/5 min. - [94°C/45 s. - 56°C -0.3°C/ciklus /45 s - 72°C/45 s.]_{11x} -
- [94°C/45 s. - 53°C/45 s. - 72°C/45 s.]_{24x} - 72°C/5 min.**

Ovakva formula pisanja PCR reakcije (Vokurka, 2012.) znači da je početak reakcije bio na 95 °C u trajanju od pet minuta. Zatim je pokrenuta *touch down* faza s denaturacijom DNA na 94 °C u trajanju od 45 sekundi, zatim nalijeganje primera na temperaturi od 56 °C, s tim da se ova temperatura u svakom od sljedećih deset ciklusa smanjuje za 0,3 °C, nakon čega slijedi elongacija DNA na 72°C u trajanju od 45 sekundi. Nakon *touch down* faze slijedi stabilna faza od 24 ciklusa s ujednačenom temperaturom nalijeganja primera od 53°C, dok su temperature i trajanje denaturacije i elongacije fragmenata iste kao i u prethodnoj *touch down* fazi. *Touch down* faza, tj. postupno smanjivanje temperature u svakom sljedećem ciklusu omogućuje pravilnije nalijeganje primera na kalup DNA i bolju ukupnu amplifikaciju fragmenata.

Tablica 4.3. Oligonukleotidni primeri korišteni u SSR-analizi maslina

Naziv	Smjer	Sekvenca	Izvor
ssrOeUA-DCA05	<i>fw.</i>	5'-aac aaa tcc cat acg aac tgc c-3'	Sefc i sur., 2000.
	<i>rev.</i>	5'-cgt gtt gct gtg aag aaa atc g-3'	
ssrOeUA-DCA08	<i>fw.</i>	5'-aca att caa cct cac ccc cat acc c-3'	Sefc i sur., 2000.
	<i>rev.</i>	5'-tca cgt caa ctg tgc cac tga act g-3'	
ssrOeUA-DCA09	<i>fw.</i>	5'-aat caa agt ctt cct tct cat ttc g-3'	Sefc i sur., 2000.
	<i>rev.</i>	5'-gat cct tcc aaa agt ata acc tct c-3'	
ssrOeUA-DCA14	<i>fw.</i>	5'-aat ttt tta atg cac tat aat tta c-3'	Sefc i sur., 2000.
	<i>rev.</i>	5'-ttg agg tct cta tat ctc cca ggg g-3'	
ssrOeUA-DCA16	<i>fw.</i>	5'-tta ggt ggg att ctg tag atg gtt g-3'	Sefc i sur., 2000.
	<i>rev.</i>	5'-ttt tag gtg agt tca tag aat tag c-3'	
ssrOeUA-DCA18	<i>fw.</i>	5'-aag aaa gaa aaa ggc aga att aag c-3'	Sefc i sur., 2000.

Gapu71B	<i>rev.</i>	5'-gtt ttc gtc tct cta cat aag tga c-3'	Carriero et al., 2002.
	<i>fw.</i>	5'-gat caa agg aag ggg ata aa-3'	
Gapu101	<i>rev.</i>	5'-aca aca aat ccg tac gct tg-3'	Carriero et al., 2002.
	<i>fw.</i>	5'-cat gaa agg ggg aca ta-3'	
Gapu103A	<i>rev.</i>	5'-ggc act tgt gca gat tg-3'	Carriero et al., 2002.
	<i>fw.</i>	5'-tga att taa ctt taa acc cac aca-3'	
UD043	<i>fw.</i>	5'-tcg gct tta caa ccc att tc-3'	Cipriani et al., 2002
	<i>rev.</i>	5'-tgc caa tta tgg ggc taa ct-3'	

DNA ulomci iz nastali u ovoj reakciji su razdvojeni u četverokapilarnom automatskom elektroforeznom uređaju (*Genetic Analyzer 3130*), marke Applied Biosystems. Razdvajanje i vizualizacija nastalih fragmenata omogućuje jasno odjeljivanje uzoraka prema različitim duljinama (i profilima) nastalih ulomaka DNA, kao i jasno svrstavanje uzoraka u identitetne grupe (Vokurka, 2012.). Pod pojmom identitetna grupa podrazumijevaju se grupe uzoraka koje dijele jednaki SSR-profil na danom lokusu ili na većem broju različitih lokusa (Pedersen, 2006.). Cilj ovog rada je bio potvrditi jedinstveni identitet za sve četiri sorte, ne i konkretno utvrđivanje duljine alela ili eventualno postojanje sinonima sa drugim sortama, za što bi bio potreban znatno veći broj poznatih sorata koje bi poslužile za usporedbu kao referentne sorte, ili bi bilo potrebno uspoređivati duljine fragmenata (uz prilagodbe "pomaka" duljina određenim u aktualnoj analizi).

4.4. AFLP analiza

Analiza DNA metodom AFLP-a provedena je prema Vosu i sur. (1995.) koji su prvi osmislili ovaj tip analize DNA, ali je protokol modificiran na način kako je dalje opisano.

Za restrikciju (prva faza AFLP analize) genomske DNA je korišteno 1 µg genomske DNA, i to u volumenu od 50 µl, pomoću dva restrikcijska enzima. Prvi je *EcoRI* (marke *New England Biolabs*), tzv. *rare cutter* koji ima specifično mjesto restrikcije slijed od šest nukleotidnih baza. Drugi enzim, tzv. *frequent cutter* je *MseI*, također marke *New England Biolabs* i koji sječe DNA na više mjesta određenih specifičnim slijedom od četiri baze. Restrikcija je provedena u puferskom mediju sastava 10 mM TRIS-HAc, 10 mM MgAc, 50 mM KAc i 5 mM DTT. Svaki restrikcijski enzim je korišten u količini od 1 U trajanju od tri sata na temperaturi od 37°C.

Druga faza (ili drugi korak) u AFLP analizi je spajanje oligonukleotidnih adaptera, tj. dodavanje po 10 µl otopine adaptera u restrikcijsku smjesu koja sadrži 5 pmola adaptera *EcoRI* i 50 pmola adaptera *MseI*. Za spajanje adaptera (ligaciju) potreban je enzim, za što je korištena T4 DNA-ligaza (Applied Biosystems) u količini od 1U. Energija za ligaciju je korištena od ATP-a (1,2 mM), a ligacija se odvijala u puferskoj otopini od 10 mM TRIS-HAc, 10 mM MgAc, 50 mM KAc i 5 mM DTT, u trajanju od pet sati, u vodenoj kupelji namještenoj na 37°C.

Smisao adaptera jest u tome što naliježe na sebi homologne krajeve (tzv. *sticky ends*) fragmenata DNA nakon restrikcije, i to samo jednim svojim dijelom, dok je drugi dio također poznatog slijeda i služi kao osnova na koju u sljedećoj fazi, tj. fazi predamplifikacije, naliježu primeri za predamplifikaciju. Slijedovi adaptera, od kojih se svaki također sastoji od dva okraća oligonukleotidna i (djelomično) međusobno homologna fragmenta, ovisno o tome da li naliježu na krajeve fragmenata koji su rasječeni jednim ili drugim enzimom (*EcoRI* ili *MseI*) su sljedeći:

EcoRI-adapter: 5'-ctc gta gac tgc gta cc-3'
3'-ctg acg cat ggt taa-5',

MseI-adapter: 5'-gac gat gag tcc tga g-3'
3'-tac tca gga ctc at-5'.

Sljedeći korak (ili treća faza) u AFLP analizi je predamplifikacija. Predamplifikacija je grubo, početno umnažanje fragmenata čijom elektroforezom i vizualizacijom nije moguće uočiti varijabilnost u njihovoj duljini, budući da u predamplifikaciji sudjeluje manje selektivni primeri za amplifikaciju, pa su nastali fragmenti vrlo brojni i različitih su duljina. Takvi fragmenti nakon elektroforeze daju kontinuiranu sliku, budući da su i duljine takvih fragmenata poput kontinuirane varijable.

Predamplifikacija je provedena u volumenu od 50 µl od čega je 5 µl predamplificiranih ulomaka iz predamplifikacijsko-ligacijske smjese. Puferski sastav ove reakcije je 20 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂ i 50 mM KCl, uz 0,2 mM svakog dNTPa, 1,25 U Taq-polimeraze (Sigma) i po 75 ng svake predamplifikacijske oligonukleotidne početnice (M01 i E02). Ovi primeri koji naliježu na adaptere amplificiraju 1/16 ulomaka iz restrikcije, što je uvjetovano sa po jednom selektivnom bazom.

Temperaturni režim predamplifikacije koja se sastoji samo od tri osnovna koraka koji se ponavljaju 25 puta je sljedeći:

[92°C/60 s. - 60°C/30 s. - 72°C/60 s.]25x

Četvrta faza AFLP analize je selektivna amplifikacija koja se provodi uz korištenje različitih kombinacija selektivnih primera koji omogućuju vrlo selektivnu amplifikaciju fragmenata, ovisno o genotipu, i na taj način omogućuju vizualizaciju molekularnih razlika na razini DNA. Provodi se tako da se produkti predamplifikacije razrijede u omjeru 1:25 i kao takvi se koriste kao "uzorak" za selektivnu amplifikaciju. Volumen reakcije je 20 µl (1/4 ovog volumena je prethodno razrijeđen produkt predamplifikacije, 1:25), a puferski sastav joj je 20 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂ i 50 mM KCl, uz 0,2 mM svakog dNTPa, 0,4 U Taq-polimeraze (Sigma), 5 ng selektivnog primera 'E' i 30 ng primera 'M'. Primer 'E' je obilježen florescentnom oznakom kako bi bio vidljiv u uređaju za kapilarnu elektroforezu. Selektivna amplifikacija (četvrta faza AFLP analize) u kojoj primeri imaju dodatna tri selektivna nukleotida omogućuje selektivnu amplifikaciju 1/256 ulomaka, čime se postiže dovoljna gustoća umnoženih fragmenata, ali ne i prevelika kao u fazi predamplifikacije, pa u ovoj fazi vizualizirani fragmenti se ne ponašaju kao "kontinuirana varijabla". Temperaturni režim za selektivnu amplifikaciju je *touch down*, a provodi se prema sljedećem profilu:

94°C/30 s. - [94°C/30 s. - 65°C -0.7°C/ciklus/30 s - 72°C/60 s.]_{11x} -
 - [94°C/30 s. - 56°C/30 s. - 72°C/60 s.]_{24x} - 72°C/5 min.

Oligonukleotidne sekvence primera koji su korišteni u predamplifikaciji i u selektivnoj amplifikaciji navedeni su u Tablici 4.4. Deset kombinacija primera koje su korištene u ovom istraživanju su sljedeće: E36/M47, E38/M47, E36/M59, E32/M47, E32/M48, E42/M59, E40/M61, E39/M61, E33/M47 i E42/M61.

Tablica 4.4. AFLP-primeri za predamplifikaciju i amplifikaciju produkata restrikcije

	Kod	Slijed baza (i fluoresc. oznaka)	Boja
Primer E+1 (predamplifikacija)	E01	5'- gac tgc gta cca att c a -3'	
	E32	5'- gac tgc gta cca att c aac -3'	6Fam
	E33	5'- gac tgc gta cca att c aag -3'	6Fam
	E36	5'- gac tgc gta cca att c acc -3'	Vic
Primer E+3 (selektivna amplifikacija)	E38	5'- gac tgc gta cca att c act -3'	Vic
	E39	5'- gac tgc gta cca att c aga -3'	6Fam
	E40	5'- gac tgc gta cca att c agc -3'	Vic
	E42	5'- gac tgc gta cca att c agt -3'	Vic
Primer M+1 (predamplifikacija)	M02	5'- gat gag tcc tga gta a c -3'	
Primer M+3 (selekt. amplifikacija)	M47	5'- gat gag tcc tga gta a caa -3'	
	M48	5'- gat gag tcc tga gta a cac -3'	
	M59	5'- gat gag tcc tga gta a cta -3'	
	M61	5'- gat gag tcc tga gta a ctg -3'	

4.5. Statistička analiza

Matrica različitosti izvedena je na bazi binarne matrice dobivene očitanjem AFLP fragmenata. Za izradu matrice različitosti korišten je modificirani Euklidski koeficijent (*EucSQ*):

$$EucSQ = \sum (Y_{ia} - Y_{ja})^2$$

gdje Y_{ia} i Y_{ja} predstavlja frekvenciju AFLP fragmenata između analiziranih uzoraka. Matrica različitosti poslužila je kao ulazni set podataka za klaster analizu baziranoj na analizi UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages*). Izračun matrice različitosti i analiza UPGMA provedeno je pomoću statističkog programa NTSYSpc 2.21L (Rohlf, 2008).

5. Rezultati i rasprava

5.1. Rezultati analize mikrosatelitskih markera

Rezultati analize mikrosatelitskih markera prikazani su kao relativne vrijednosti koje su označene slovima abecede. Analizom SSR markera utvrđen je isti identitet uzoraka sorata koje su, kao što je i pretpostavljeno, atribuirane upravo pod tim imenom pod kojim su atribuirane. To znači da svi uzorci sakupljeni s bilo kojeg dijela stabla, ili sa bilo kojeg stabla atribuiranog pod istim imenom, pripadaju istoj sorti. Pojedini slučajevi unutar iste sorte nemaju isti genetski profil, (ipak se ne nalaze unutar iste identitetne skupine), međutim razlike u samo dva ili tri alela nisu toliko velike da bi bilo riječi o različitim sortama. Ove razlike u genetskim profilima dobivenima na temelju analize mikrosatelitskih lokusa prikazuje Tablica 5.1.

Tablica 5.1. Analiza SSR lokusa kod četiri sorte maslina: aleli su označeni slovima (a, b, c, d, itd.), a razlike su istaknute različitim bojom:

	Dca16	Dca16	Dca9	Dca9	Dca14	Dca14	Dca5	Dca5	Gapu71B	Gapu71B	Gapu103A	Gapu103A	Gapu101	Gapu101	DCA18	DCA18	Udo 43	Udo 43	DCA08	DCA08
Drb1-g.2	b	c	f	f	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	a	e	a	b
Drb1-p.2.v.2	b	c	f	f	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	e	e	a	b
Drb1-g.1.v.1	b	c	f	f	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	a	e	a	b
Drb1-g.1	b	c	g	g	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	a	e	a	b
Drb1-p.1	b	c	f	f	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	a	e	a	b
Drb2-p.1	b	c	e	f	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	a	e	a	b
Drb3-p.1	b	c	b	f	d	d	a	b	b	c	b	c	a	c	a	c	a	c	a	b
Gal1-g.2	a	c	a	f	c	d	a	b	c	d	b	d	a	d	a	c	b	d	a	c
Gal1-g.1	a	c	a	f	c	d	a	b	c	d	b	d	a	d	a	c	b	d	a	c
Gal1-v.2	a	c	a	f	c	d	a	b	c	d	b	d	a	d	a	c	b	d	a	c
Gal1-v.1	a	c	a	f	c	d	a	b	c	d	b	d	a	d	a	c	b	d	a	c
Krb1-p.1.g.1	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb1-p.3.g.1	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb1-p.3.g.2	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb1-p.3.v.1	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb1-p.3.g.3	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb1-p.1.v.1	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb1-p.2.v.1	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	a	f	d	e
Krb2-p.1	b	b	c	f	b	d	a	a	b	c	a	a	b	e	b	d	c	c	d	e
Krb4-p.1	b	c	d	f	b	d	a	c	b	c	a	b	a	e	a	b	e	f	a	d
Krb4-p.1.i.1	b	c	d	f	b	d	a	c	b	c	a	b	a	e	a	b	e	f	a	d
Ost2-p.1	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-v.2	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-p.2	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-v.1	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-v.3	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-p.3.g.1	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-p.1.g.1	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c
Ost1-p.2.g.1	d	d	a	d	a	c	a	c	a	b	b	c	a	f	a	a	a	a	a	c

Prema Baldoniju (2009.) potrebno je minimalno četiri različita alela na ovih deset SSR lokusa da bi bio zadovoljen uvjet da se radi o unutarstornoj varijabilnosti. Razlike u pojedinim alelima postoje čak i između različitih pozicija na jednom stablu, što već indicira na postojanje mutacija.

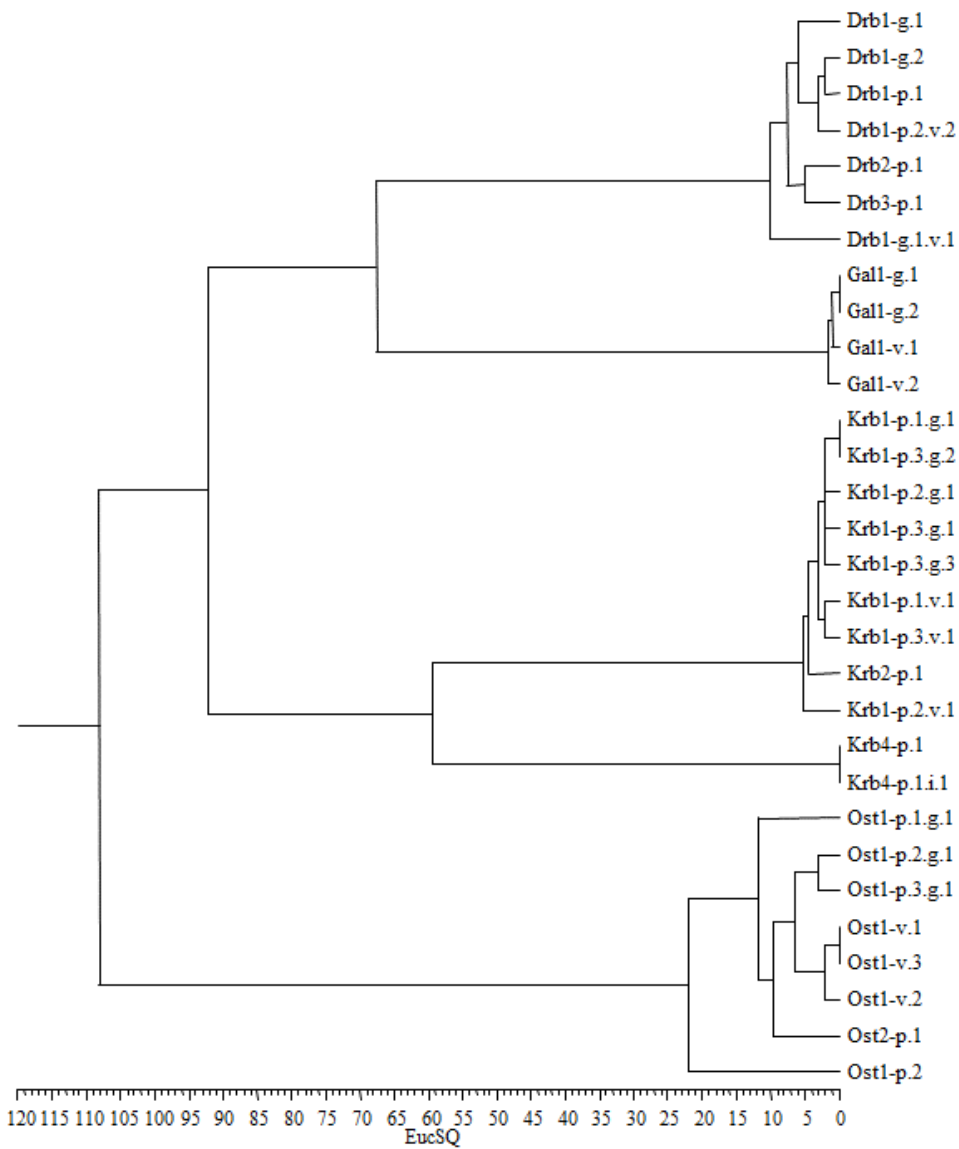
Sorta 'Drobnica' (Tablica 5.1.) čiji su uzorci sakupljeni na tri različita stabla, i sa različitih pozicija kod stabla br. 1 (Drb1) pokazuje određenu razinu varijabilnosti, kako između stabala, tako i unutar stabla Drb1. Stablo 'Drobnice' Drb1 je izrazito "razvedeno" pa uzorak sakupljen na guki br.1 (g.1) ima sasvim drugačiji profil na lokusu Dca9. Razlike unutar stabla Drb1 vidljive su i na lokusu Udo43, i to na panju br.2 i vrhu br.2, odnosno na vršnom dijelu stabla Drb1 koji izbija iz panja br.2. Ovaj uzorak (Drb1-p.2.v.2) se na lokusu Udo43 razlikuje u jednom alelu. Postoje i razlike između stabala, pa tako na lokusu Dca9 u po jednom alelu se razlikuju i preostala dva uzorka sakupljena sa različitih stabala (Drb2 i Drb3), a u jednom alelu se razlikuje i uzorak stabla Drb3 na SSR lokusu Udo43.

Sorta 'Karbunčela' (Tablica 5.1.) čiji su uzorci sakupljeni na tri različita stabla, pokazuje određenu razinu varijabilnosti između stabla, no ne i unutar stabla. Stablo Krb4, gdje su uzorci uzeti iz panja br. 1 i izboja br.1, razlikuje se od stabla Krb1 i Krb2 na SSR lokusima Dca9, Dca5, Gapu103A, Gapu101, Dca18 i Dca08 u jednom alelu. Na lokusu Udo43 sva tri stabla imaju međusobno drugačiji genetski profil. Dva uzorka sa stabla Krb4 razlikuju se na sedam alela od preostalih uzoraka, pa je ovdje riječ o unutarstornoj varijabilnosti.

Kod sorata 'Galica' i 'Oštrica' (Tablica 5.1.) nisu uočene razlike unutar stabala ili između stabala niti na jednom SSR alelu, što znači da na razini SSR markera, odnosno na razini ovih lokusa na kojima je provedena analiza, nisu uočene mutacije, odnosno varijabilnost koja je posljedica ovih mutacija. Ovo ipak ne znači da mutacija nema, samo što pomoću ovih SSR markera one nisu ustanovljene.

5.2. Rezultati analiza AFLP markera

AFLP analiza na deset kombinacija selektivnih primera pokazuje varijabilnost unutar pojedinih sorata, kao i unutar pojedinih stabala iste sorte. Graf 5.1. prikazuje grupiranje svih uzoraka uključenih u istraživanje, tj. prikazuje sve uzorke sve četiri sorte ('Drobnica', 'Oštrica', 'Karbunčela' i 'Galica'). Dendrogram dobiven UPGMA analizom na temelju Euklidske distance prikazuje ukupan (tj. egzaktn) broj AFLP fragmenata u kojem se razlikuju pojedini uzorci. 'Drobnica' i 'Galica' se grupiraju u jednu grupu, ali svaka sorta se grupira u dvije zasebne podgrupe. Drugu grupu čine uzorci 'Karbunčele', ali i unutar ove grupe izdvajaju se dva uzorka sa stabla Krb4, koja to stablo izdvajaju u posebnu podgrupu. I na kraju, posebnu grupu sačinjavaju uzorci sorte 'Galica' kod koje se niti jedan uzorak posebno ne izdvaja.

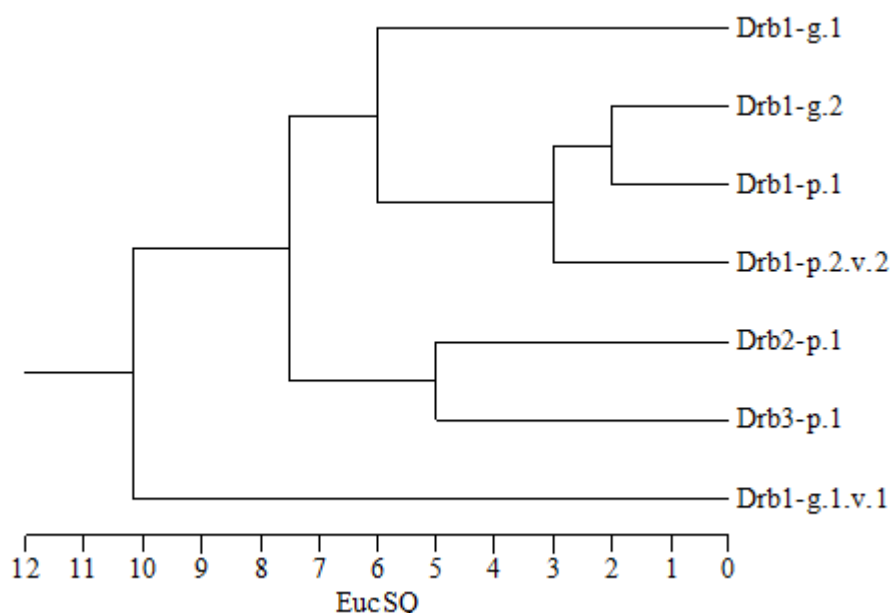


Graf 5.1. UPGMA dendrogram zasnovan na AFLP analizi i modificiranom Euklidskom koeficijentu za sve uzorke sorata zastupljenih u istraživanju

Svrha našeg istraživanja je ipak usmjerena na varijabilnost, odnosno na razlike prisutne unutar iste sorte, a posebno unutar istoga stabla. Zbog toga je važan broj alela u kojima se pojedini uzorci razlikuju, i to unutar sorte i stabla. Ovaj broj je prikazan posebno u tablicama (Tablice 5.2., 5.3., 5.4., 5.5.) za svaku sortu.

Tablica 5.2. Razlike između svih uzoraka sorte 'Drobnica', sa tri stabla (Drb1, Drb2 i Drb3) i različitih pozicija unutar tih stabala, dobiven na temelju AFLP markera i modificirane Euklidske distance

EucSQ I Drb	Drb1-g.1	Drb1-g.2	Drb1-p.1	Drb1-p.2.v.2	Drb1-g.1.v.1	Drb2-p.1	Drb3-p.1
Drb1-g.1	0						
Drb1-g.2	5	0					
Drb1-p.1	5	2	0				
Drb1-p.2.v.2	8	3	3	0			
Drb1-g.1.v.1	13	10	8	7	0		
Drb2-p.1	9	8	8	11	12	0	
Drb3-p.1	6	5	5	8	11	5	0



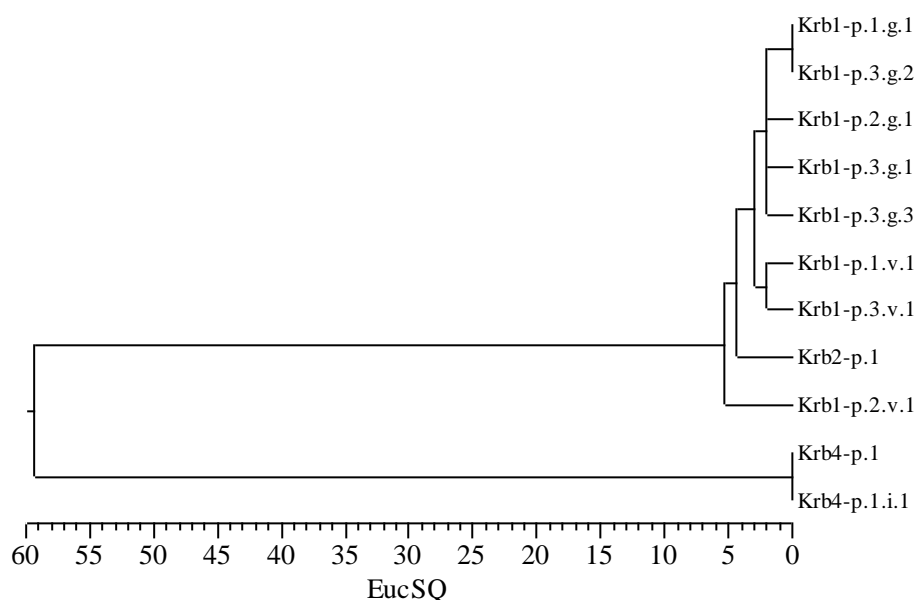
Graf 5.2. UPGMA dendrogram zasnovan na AFLP analizi i modificiranom Euklidskom koeficijentu za uzorke sorte 'Drobnica' sa tri stabla (Drb1, Drb2 i Drb3) i različitih pozicija unutar tih stabala

Graf 5.2. prikazuje razlike između pojedinih uzoraka sorte 'Drobnice', i u njemu je vidljivo da uzorak sa stabla (genotipa) Drb1 sakupljen iz guke br. 1 i vrha najviše odudara od ostalih uzoraka bez obzira jesu li sakupljeni na istom stablu ili s različitih stabala. Koeficijent prikazan u Tablici 5.2. također ukazuje da je najveća razlika unutar svih uzoraka ima 13 markera, a utvrđena je između uzorka Drb1-g.1.v.1 i Drb1-g.1, dakle, unutar istog stabla, odnosno sa iste guke ali sa različitog vrha (izboja) iz navedene guke. Ovaj rezultat jasno ukazuje na činjenicu da se uzorci s različitih pozicija istog stabla mogu razlikovati u genetskoj strukturi, što je vjerojatno posljedica nakupljenih mutacija unutar istog stabla. Ovakav rezultat korespondira sa

rezultatima SSR analize, u kojima se uzorak Drb1-g.1 također bitno razlikuje od ostalih uzoraka 'Drobnice', i to onih sakupljenih na istom stablu, kao i uzorka sa drugog stabla.

Tablica 5.3. Razlike između svih uzoraka sorte 'Karbunčela' (tri različita stabla: Krb1, Krb2 i Krb4) i različitih pozicija unutar tih stabala dobiven na temelju AFLP markera i modificirane Euklidske distance

EucSQ	Krb1- p.1.g.1	Krb1- p.2.g.1	Krb1- p.3.g.1	Krb1- p.3.g.2	Krb1- p.3.g.3	Krb1- p.1.v.1	Krb1- p.2.v.1	Krb1- p.3.v.1	Krb2-p.1	Krb4-p.1	Krb4- p.1.i.1
Krb1-p.1.g.1	0										
Krb1-p.2.g.1	2	0									
Krb1-p.3.g.1	2	2	0								
Krb1-p.3.g.2	0	2	2	0							
Krb1-p.3.g.3	2	2	2	2	0						
Krb1-p.1.v.1	3	3	3	3	3	0					
Krb1-p.2.v.1	4	4	6	4	6	5	0				
Krb1-p.3.v.1	3	3	3	3	3	2	7	0			
Krb2-p.1	3	5	3	3	5	6	7	6	0		
Krb4-p.1	59	59	59	59	57	60	63	60	58	0	
Krb4-p.1.i.1	59	59	59	59	57	60	63	60	58	0	0

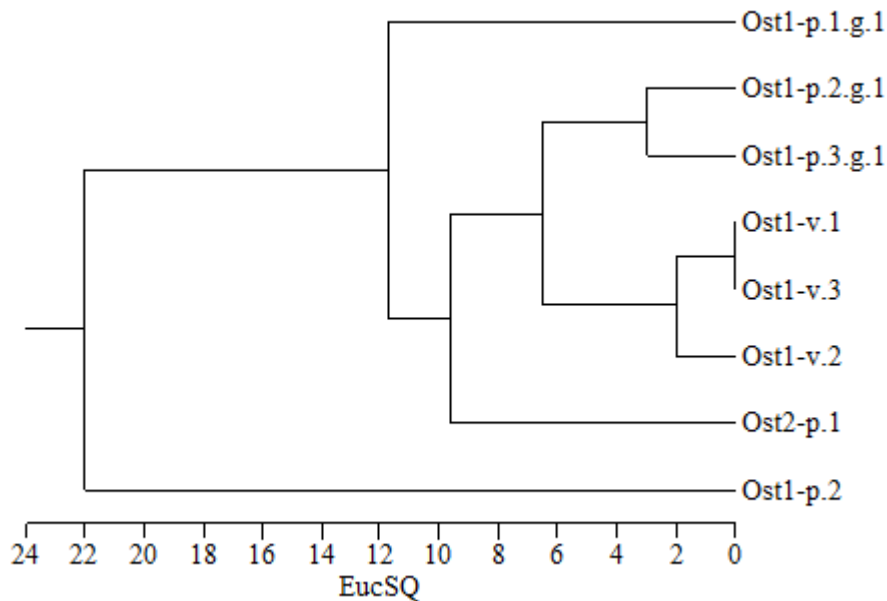


Graf 5.3. UPGMA dendrogram zasnovan na AFLP analizi i modificiranom Euklidskom koeficijentu za uzorke sorte 'Karbunčela' sa tri stabla (Krb1, Krb2 i Krb3) i različitih pozicija unutar tih stabala

Graf 5.3. prikazuje razlike između pojedinih uzoraka sorte 'Karbunčela', i u njemu je vidljivo da uzorak sa stabla (genotipa) Krb4 sakupljen iz panja br.1 i izboja br. 1 najviše odudara od ostalih uzoraka sa stabla Krb1 i Krb 2. Koeficijent prikazan u Tablici 5.3. također ukazuje da je najveća razlika unutar svih uzoraka najviše 63 markera, a koji oba uzorka sa stabla Krb4 razlikuju od uzorka sakupljenog sa stabla Krb1-p.2.v.1 te 58 markera koji uzorke sa stabla Krb4-p.1.i.1. razlikuju od uzorka sakupljenog sa stabla Krb2-p1. Što se tiče varijabilnosti unutar stabla, ne postoji razlika osim kod stabla Krb1. Isto tako, uzorak sa stabla Krb2 se grupira unutar uzoraka sa stabla Krb1, dok se uzorci sa stabla Krb4 odvajaju u posebnu grupu. Ovi rezultati pokazuju da se uzorci s različitih stabla razlikuju u genetskoj strukturi, što je vjerojatno posljedica mutacija. Kod 'Karbunčele' postoji najveća varijabilnost koja, ako se uzmu u obzir i podaci SSR analiza prema kojima se uzorci sa stabla Krb4 razlikuju u sedam alela od uzoraka sa preostala dva stabla, koja se može opisati i kao unutarSORTNA varijabilnost. Ovakva varijabilnost može biti i osnova za klonsku selekciju, pod uvjetom da se ispolji ne samo na SSR profilu nego i na svojstvima značajnim u proizvodnji.

Tablica 5.4. Razlike između svih uzoraka sorte 'Oštrica' sa dva stabla (Ost1 i Ost2) dobiven na temelju AFLP markera i modificirane Euklidske distance

EucSQ	Ost1- p.1.g.1	Ost1- p.2.g.1	Ost1- p.3.g.1	Ost1- p.2	Ost1- v.1	Ost1- v.2	Ost1- v.3	Ost2- p.1
Ost1-p.1.g.1	0							
Ost1-p.2.g.1	8	0						
Ost1-p.3.g.1	9	3	0					
Ost1-p.2	24	22	21	0				
Ost1-v.1	13	7	6	23	0			
Ost1-v.2	15	7	6	23	2	0		
Ost1-v.3	13	7	6	23	0	2	0	
Ost2-p.1	12	6	9	18	11	11	11	0

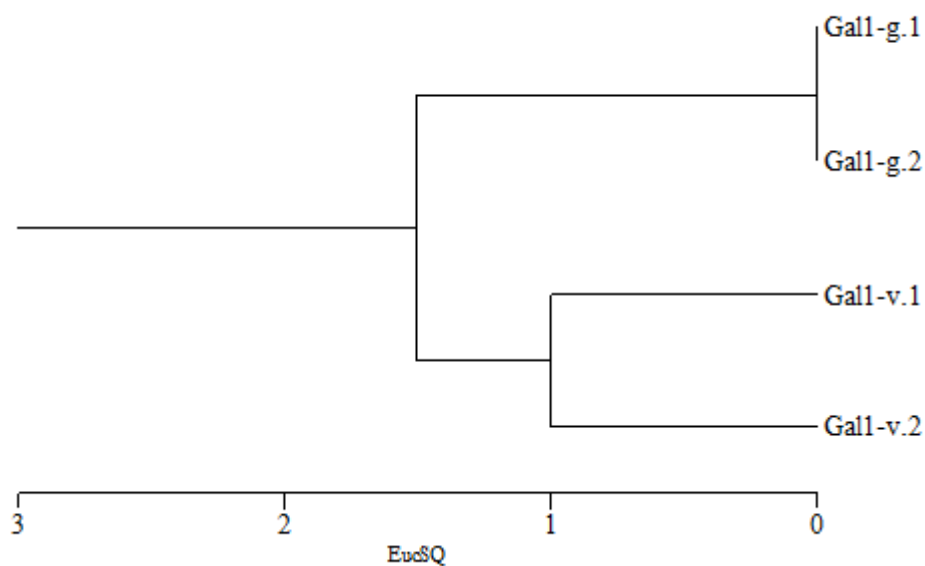


Graf 5.4. UPGMA dendrogram zasnovan na AFLP analizi i modificiranom Euklidskom koeficijentu za uzorke sorte 'Oštrica' sa dva stabla (Ost1 i Ost2) i različitim pozicija unutar tih stabala

Graf 5.4. prikazuje razlike između pojedinih uzoraka sorte 'Oštrica', i u njemu je vidljivo da uzorak sa stabla (genotipa) Ost1 sakupljen iz panja br. 2 najviše odudara bez obzira jesu li sakupljeni na istom stablu ili s različitim stabala. Koeficijent prikazan u Tablici 5.4. također ukazuje da ima 24 markera koji ovaj uzorak razlikuju od uzorka sakupljenog sa istog stabla, ali sa drugih pozicija (Ost1-p.1.g1.), odnosno sa drugog panja i guke. Uzorci sa stabla Ost1-v.1, v.2 i v.3 razlikuju se u 23 markera od uzorka sa istog stabla, ali iz različitim dijelova (Ost1-p.2). Također, uzorci uzeti sa istog stabla Ost1, ali iz različitim pozicija p.2 i p.2.g.1, odnosno iz istog panja, ali iz različite guke, razlikuju se u 22 markera. Uzorak sa stabla Ost2-p.1 se grupira unutar uzoraka sa stabla Ost1, dok se uzorak panja br. 2 sa stabla Ost1 odvaja u posebnu grupu. Ovaj rezultat ukazuje na činjenicu da se uzorci s različitim pozicija istog stabla mogu razlikovati u genetskoj strukturi, što je vjerojatno posljedica nakupljenih mutacija unutar istog stabla. Ovakav rezultat je u suprotnosti sa rezultatima dobivenim SSR markerima kod kojih nisu uočene razlike unutar istog stabla.

Tablica 5.5. Razlike između uzoraka sorte 'Galica' sa jednog stabla (Gal1) dobiven na temelju AFLP markera i modificirane Euklidske distance

	Gal1-g.1	Gal1-g.2	Gal1-v.1	Gal1-v.2
Gal1-g.1	0			
Gal1-g.2	0	0		
Gal1-v.1	1	1	0	
Gal1-v.2	2	2	1	0



Graf 5.5. UPGMA dendrogram zasnovan na AFLP analizi i modificiranom Euklidskom koeficijentu za uzorke sorte 'Galica' sa stabla Gal1 i različitih pozicija unutar stabala

Graf 5.5. prikazuje da se uzorci sa stabla Gal1, sakupljenog iz vrha br. 1 i 2 razlikuje od uzorka sa istog stabla sakupljenog iz guke br. 1 i 2, pri čemu se i međusobno razlikuju. Koeficijent u Tablici 5.5. ukazuje da ima 2 markera koji razlikuju uzorak sakupljen na stablu Gal1-v.2 od uzorka sakupljenog sa istog stabla, ali sa drugih pozicija (Gal1-g.1. i g.2.), odnosno sa druge dvije guke. Razlika u genetskoj strukturi je u ovom slučaju zanemariva budući da se radi o razlici u svega dva alela. Ovaj rezultat ujedno ukazuje da je 'Galica' sorta s najmanje razlika unutar različitih pozicija unutar istog stabla.

6. Zaključak

Na temelju SSR analize i AFLP analize uzoraka DNA sa po nekoliko stabala sorata 'Drobnica', 'Karbunčela', 'Oštrica' i 'Galica' i sa više različitih pozicija na stablu (guka, panj, izboji, vrh), moguće je zaključiti sljedeće:

1. Općenito, maslina je kultura koja je, zbog svoje dugovječnosti, podložna visokoj genetskoj varijabilnosti kao vjerojatnoj posljedici akumuliranih mutacija, a ta varijabilnost može biti prisutna čak i unutar istog stabla na njegovim različitim dijelovima (pozicijama) i može biti različitog intenziteta;
2. Kod sorata 'Oštrica' i 'Galica' nema varijabilnosti detektirane SSR markerima, dok varijabilnost AFLP markera postoji, ali je nižeg intenziteta;
3. Kod sorata 'Drobnica' ustanovljena je varijabilnost SSR markera, ali samo do tri alela između različitih stabala (ne i unutar istog stabla) što nije dovoljno da bi se ova varijabilnost mogla okarakterizirati kao unutarSORTNA varijabilnost. Postoji veća razina AFLP varijabilnosti nego kod 'Oštrice' i 'Galice', i to do 13 alela unutar jednog stabla: vrh izboja u odnosu na uzorak izravno s guke iz koje izlazi isti taj izboj;
4. Genetski profil jednog stabla sorte 'Karbunčela' razlikuje se na sedam SSR alela u odnosu na preostala stabla, što znači da je riječ o unutarSORTNOJ varijabilnosti. Razlike SSR alela unutar istog stabla postoje, ali nisu veće od sedam alela, što je minimum za unutarSORTNU varijabilnost;
5. Isto stablo 'Karbunčele' kod kojeg je zabilježena razlika od sedam SSR alela odlikuje se i relativno visokom varijabilnošću AFLP markera, i to ovisno o poziciji, od 57-63 različita alela u odnosu na preostala dva stabla između kojih su razlike u broju alela minimalne.

Iako je u istraživanje je uključen manji broj uzoraka, on je ipak dovoljan da kao preliminarno istraživanje potvrdi hipotezu da se unutar jednog stabla može akumulirati određena razina varijabilnosti koja ne mora biti toliko velika da bude značajna za selekciju, ali ipak ukazuje na mogući put nastanka mutacija kod starih stabala. S druge strane, varijabilnost između različitih stabala iste sorte može biti na razini unutarSORTNE varijabilnosti koja je osnova za klonsku selekciju. Preliminarni rezultati ukazuju na opravdanost uključivanja većeg broja uzoraka i sorata u sličan koncept istraživanja.

7. Popis literature

1. Abdelhamid S., Omri A., Grati-Kamoun N., Paolo Marra F. Caruso T. (2017). Molecular characterization and genetic relationships of cultivated Tunisian olive varieties (*Olea europaea* L.) using SSR markers. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*. 40(5), 2175-2185
2. Abdessemeda S., Muzzalupo I., Benbouza H. (2015). Assessment of genetic diversity among Algerian olive (*Olea europaea* L.) cultivars using SSR marker. *Scientia Horticulturae*. 192, 10–20
3. Ayed R. B., Hassen H. B. Ennouri K., Marzoug R. B., Rebai A. (2016). OGDD (Olive Genetic Diversity Database): a microsatellite markers' genotypes database of worldwide olive trees for cultivar identification and virgin olive oil traceability. *Database*. Vol. 2016
4. Baldoni L., Cultrera N.G., Mariotti R., Ricciolini C, Arcioni S., Vendramin G. G., Buonamici A., Porceddu A., Sarri V., Ojeda M. A., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Muzzalupo I, Casagrande A., Lain O., Messina R., Testolin R. (2009). A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol Breeding*. 24:213–231
5. Bandelj D., Jakše J., Javornik B. (2002). DNA Fingerprinting of Olive Varieties by Microsatellite Markers. *Food Technol. Biotechnol*. 40 (3) 185–190
6. Bandelj D., Jakše J., Javornik B. (2004). Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica*. 136: 93–102
7. Bandelj, D., J. Jakše & B. Javornik, 2001. Identification of olive (*Olea europaea* L.) cultivars by molecular markers. *Res. Reports, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Agricultural Issue*. 77: 11–17
8. Barta Cs.E., Bolender B., Bilby S.R., Brown J.H., Brown R.N., Duryee A.M., Edelman D.E., Gray C.E., Gossett C., Haddock A.G., Helsel M.M., Jones A.D., Klingseis M.E., Leslie K., Miles E.W., Prawitz E.A. (2017). In situ dark adaptation enhances the efficiency of DNA extraction from mature pin oak (*Quercus palustris*) leaves, facilitating the identification of partial sequences of the 18S rRNA and isoprene synthase (*IspS*) genes. *Plants* 6(52)
9. Belaj A., Šatović Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor Appl Genet*. 107:736–744
10. Belaj A., Šatović Z., Rallo L., Trujillo I. (2002). Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theor Appl Genet*. 105:638–644
11. Besnard G., Baradat P., Berville A. (2001). Genetic relationship in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet* 102:251–258
12. Breton C., Pinatel C., Médail F., Bonhomme F., Berville A. (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant Science*. 175 524–532
13. Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet*. 104:301–307

14. Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor Appl Genet.* 104:223–228
15. Contento A., Ceccarelli M., Gelati M. T., Maggini F., Baldoni L., Cionini P. G. (2002). Diversity of *Olea* genotypes and the origin of cultivated olives. *Theor Appl Genet.* 104:1229–1238
16. Diaz, A., De la Rosa, R., Martin, A., Rallo, P. (2006). Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genet. Genomes* 2: 165–175
17. Doveri S., Gil F. S., Diaz A., Reale S., Busconi M., Machado A. C., Martin A., Fogher C., Donini P., Lee D. (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae.* 116 367–373
18. Durgac C., Kiyga Y., Ulas M. (2010). Comparative molecular analysis of old olive (*Olea europaea* L.) genotypes from Eastern Mediterranean region of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 428–433
19. Ercisli S., Benčić Đ., Ipek A., Barut E., Z. Liber (2012). Genetic relationships among olive (*Olea europaea* L.) cultivars native to Croatia and Turkey. *Journal of Applied Botany and Food Quality.* 85, 144 - 149
20. Ercisli S., Ipek A., Barut E. (2011). SSR Marker-Based DNA Fingerprinting and Cultivar Identification of Olives (*Olea europaea*). *Biochem Genet.* 49:555–561
21. Gomes S., Martins-Lopes P., Lopes J., Guedes-Pinto H. (2009). Assessing Genetic Diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers. *Plant Mol Biol Rep.* 27:365–373
22. Gugerli F., Parducci L., Patit R.J. (2004). Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytol.* 199, 409-418
23. Ipek A., Barut E., Gulen H., Ipek M. (2012). Assessment of inter- and intra-cultivar variations in olive using SSR markers. *Sci. Agric.* v.69, n.5, p.327-335
24. Joshi M., Deshpande J.D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research.* 1 [5] 81-97
25. Kumar P., Gupta V. K., Misra A. K., Modi D. R., Pandey B. K. (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal.* 2(4):141-162
26. Lazović B., Klepob T., Adakalić M., Šatović Z., Baruca Arbeiter A., Hladnik M., Strikić F., Zlatko Liber Z., Bandelj D. (2018). Intra-varietal variability and genetic relationships among the homonymic East Adriatic olive (*Olea europaea* L.) varieties. *Scientia Horticulturae* 236, 175–185
27. Linos A., Nikoloudakis N., Katsiotis A., Hagidimitriou M. (2014). Genetic structure of the Greek olive germoplasm revealed by RAPD ISSR and SSR markers. *Sci.Hortic.* 175: 33–43.
28. Miljković I., Žužić I., Pucci C., Baldoni L., Mariotti M., Cultrera N. G. M. (2010). Molecular characterization of an ancient *Olea europaea* tree located on the Brijuni islands of (Croatia) by SSR markers analysis. *Pomologia Croatica.* Vol. 16, br. 1-2
29. Muzzalupo I., Muto A., Badolati G., Veizi A., Chiappetta A. (2018). Genotyping of Albania olive (*Olea europaea*) germplasm by SSR molecular marker. *Emirates Journal of Food and Agriculture.* 30(7): 573-580
30. Nadeem M. A. i sur. (2017). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 32:2, 261-285

31. Pasqualone A., Caponio F., Blanco A. (2001). Inter-simple sequence repeat DNA markers for identification of drupes from different *Olea europaea* L. cultivars. *Eur Food Res Technol.* 213:240–243
32. Pedersen, B.H. (2006). DNA fingerprints of 51 sweet and sour *Prunus* accessions using Simple Sequence Repeats. *J Hortic Sci Biotech.* 81(1): 118-124
33. Pejić I., Vokurka A., Šimon S., Žulj Mihaljević M. (2012). *Biotehnologija u oplemenjivanju bilja.* Interna skripta, Zagreb.
34. Poljuha D., Sladonja B., Brkić Bubola K., Radulović M., Brščić K., Šetić E., Krapac M., Milić A. (2008). A Multidisciplinary Approach to the Characterisation of Autochthonous Istrian Olive (*Olea europaea* L.) Varieties. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (4) 347–354
35. Poljuha D., Sladonja B., Šetić E., Milić A., Bandelj D., Jakše J., Javornik B. (2008). DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. *Scientia Horticulturae.* 115, 223–230
36. Rallo P., Dorado G., Martín A. (2000). Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet.* 101:984–989
37. Rekik I., Salimonti A., Kammoun, N.G., Lepais O., Gerber S., Perri E., Rebaï A. (2008). Characterization and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. *Sci. Hortic.* 43: 1371–1376
38. Rohlf, F.J. 2008. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system.* ver. 2.2. Exeter Software. Setauket, New York. 11733-2870
39. Rotondi A., Magli M., Ricciolini C., Baldoni L. (2003). Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica.* 132: 129–137
40. Sanz-Cortes F., Parfitt D. E., Romero C., Struss D., Llacer G., Badenes M. L. (2003). Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. *Plant Breeding.* 122, 173—177
41. Sefc K. M., Lopes M. S., Mendonça D., Rodrigues Dos Santos M., Laimer Da Câmara Machado M., Da Câmara Machado A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian trees. *Molecular Ecology* 9, 1171-1173.
42. Sensia E., Vignania R., Scalia M., Masib E., Crestia M. (2003). DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea* L. estimated by AFLP analysis. *Scientia Horticulturae.* 97, 379–388
43. Strikić F., Bandelj Mavsar D., Perica S., Čmelik Z., Šatović Z., Javornik B. (2009). The main Croatian olive cultivar, 'Oblica', shows high morphological but low molecular diversity. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* 84 (3) 345–349
44. Vokurka, A. (2012). *Genetska analiza hrvatskih autohtonih sorata trešnje (Prunus avium L.).* Agronomski fakultet, Zagreb
45. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res.* 23, 4407-4414
46. Zaher H., Boulouha B., Baaziz M., Sikaoui L., Gaboun F., Udupa S. M. (2011). Morphological and genetic diversity in olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) clones and varieties. *POJ.* 4(7):370-376

INTERNETSKI IZVORI

NCBI - National Center for Biotechnology Information

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrfp/> - pristup 22.02.2021.

Paićuša udruga maslinara - Pisak

<http://www.paicusa.hr/hr/81/oprasivanje-maslina/> - pristup 26.2.2021.

Guo-Liang Jiang (2012). Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants

<https://shorten.one/L7vGb> - pristup 4.3.2021.

Životopis

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Mia Majić

Datum i mjesto rođenja: 18.02.1997., Zagreb

OBRAZOVANJE:

2018. – 2021. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, diplomski studij, smjer Biljne znanosti

2015. – 2018. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, preddiplomski studij, smjer Hortikultura

2011. – 2015. XI. gimnazija, opća gimnazija

GLAZBENA ŠKOLA:

2004. – 2010. Glazbena škola Zlatka Balokovića (osnovna škola, klavir)

2012. – 2016. Glazbena škola Blagoje Bersa (srednja škola, solo pjevanje)

STRANI JEZIK:

1. Engleski jezik: razumijevanje, govor i pisanje (C1)
2. Njemački jezik: razumijevanje, govor i pisanje (B2)

INTERESI: Pjevanje, volontiranje

VOZAČKA DOZVOLA: B-kategorija

VJEŠTINE I KOMPETENCIJE:

1. Napredno korištenje Microsoft Office paketa (Word, Excel, Powerpoint)
2. Osnove rada u GIS sustavu
3. Certifikat o osposobljavanju voditeljice izradbe i provedbe projekata financiranih iz EU fondova na visokom učilištu Algebra
4. Volontiranje – Arka Korablja (rad s ljudima s intelektualnim teškoćama); Crveni križ (pomaganje korisnicima Crvenog križa); Klaićeva bolnica (pjevanje bolesnoj djeci, roditeljima i osoblju)